

U N I V E R S I T E P A R I S V I I

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES

présentée par

Doris CASSIO

Sujet de la thèse : RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE ET LES FONCTIONS DE LA
METHIONYL-tARN SYNTHETASE D'ESCHERICHIA COLI.

Soutenue le 25 Mai 1971

devant le Jury composé de :

MM. R. DEDONDER	Président
F. CHAPEVILLE	Examineurs
G.N. COHEN	
J.P. WALLER	

U N I V E R S I T E P A R I S V I I

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES

présentée par

Doris CASSIO

Sujet de la thèse : RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE ET LES FONCTIONS DE LA
METHIONYL-tARN SYNTHETASE D'ESCHERICHIA COLI.

Soutenue le 25 Mai 1971

devant le Jury composé de :

MM. R. DEDONDER	Président
F. CHAPEVILLE	Examineurs
G.N. COHEN	
J.P. WALLER	



Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41556021_0033

Étude de la méthionyl-tRNA Synthétase d'*Escherichia coli*

3. Dissociation en sous-unités actives par action d'un facteur extrinsèque

D. CASSIO et J. P. WALLER

Laboratoire d'Enzymologie du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Reçu le 7 février 1968)

1. Methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* extracts conserved at 0° has an apparent molecular weight of 175,000 estimated by gel filtration through Sephadex G-200, and a sedimentation coefficient of 6.5 S determined by sucrose density gradient centrifugation.

2. Incubation of the extract at 37° results in a time-dependent modification of methionyl-tRNA synthetase into an enzymatically active form, which has an apparent molecular weight of 54,000 and a sedimentation coefficient of 3.7 S. Under the same conditions of incubation, the Sephadex G-200 elution profile of several other aminoacyl-tRNA synthetases remains unaltered.

3. This modification of methionyl-tRNA synthetase is observed upon incubation of extracts derived from *E. coli* K12 or B cells grown under a variety of conditions (in minimal or enriched medium, at exponential or stationary phase).

4. The modified enzyme, which was partially purified by chromatography on hydroxylapatite, catalyses the formation of aminoacyl adenylate and also of aminoacyl-tRNA, using tRNA_F as well as tRNA_M. Furthermore, the K_m values for various substrates of the two reactions do not differ significantly from those of the native enzyme. However, conversion into the modified enzyme is accompanied by a decrease in specific activity, and by an increase in the ratio of ATP-PP_i exchange capacity to aminoacyl-tRNA forming capacity.

5. Incubation of the modified enzyme at 37° in the presence of the substrates for each of the two reactions, followed by sucrose density gradient centrifugation in the presence of these substrates, does not lead to reversion to the native form. Thus, the ability to catalyze both reactions appears to be an intrinsic property of the modified enzyme.

6. In contrast to the behaviour of methionyl-tRNA synthetase in crude extracts, the partially or totally purified enzyme remains unaltered upon incubation at 37°. This observation has led to the demonstration that the extract contains a macromolecular component, readily separable from methionyl-tRNA synthetase, which is responsible for the conversion of the native to the modified enzyme.

7. Earlier studies on the purified enzyme [1] have shown that methionyl-tRNA synthetase from *E. coli*, with a molecular weight of 173,000, undergoes dissociation in the presence of 8 M urea or 6 M guanidine into four subunits which have a molecular weight of 43,000, and which appear to be homogenous by sedimentation analysis and polyacrylamide gel electrophoresis. In the light of those observations, the modification of methionyl-tRNA synthetase reported in this paper is tentatively interpreted as the conversion, mediated by a macromolecular component in the extract, of the native enzyme into enzymatically active subunits. Work is in progress to elucidate the structural relationship between these enzymatically active subunits, and the subunits produced upon treatment of the purified enzyme with dissociating reagents.

Au cours d'études précédentes [1], il a été démontré que la méthionyl-tRNA synthétase d'*Escherichia coli* K12 possède un poids moléculaire de 173.000 et

Abréviations non usuelles. tRNA_F, acide ribonucléique de transfert accepteur de la méthionine, pouvant exister sous la forme de formylméthionyl-tRNA; tRNA_M, acide ribonucléique de transfert accepteur de la méthionine, ne pouvant exister que sous la forme de méthionyl-tRNA.

Enzymes. Aminoacyl-tRNA synthétase (EC 6.1.1); peroxydase (EC 1.11.1.7); alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1).

qu'en présence d'urée 8 M ou de chlorhydrate de guanidine 6 M, cet enzyme se dissocie en sous-unités dont le poids moléculaire est de 43.000.

Dans le présent travail, nous décrivons des conditions dans lesquelles l'enzyme se dissocie en sous-unités actives qui catalysent les deux réactions spécifiques de l'enzyme natif, et dont le poids moléculaire apparent, estimé par filtration sur Sephadex G-200, est de l'ordre de 55.000.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le RNA de transfert d'*E. coli* B provient de General Biochemical Corp. (Chagrin Falls, Ohio). Les deux types de tRNA d'*E. coli* spécifiques de la méthionine, totalement séparés l'un de l'autre, ont été aimablement offerts par Mme M. Grunberg-Manago. La concentration de tRNA a été estimée par mesure de l'absorbance à 260 m μ , 24 unités d'absorbance étant équivalentes à 1 mg. Les L-amino-acides chromatographiquement purs ont été fournis par Mann Research Laboratories (New York). Le [32 P]pyrophosphate de sodium ainsi que les amino-acides marqués sont des produits du Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay). Les amino-acides marqués ont été purifiés selon le procédé précédemment décrit [2]. Le L-méthioninyl adénylate a été synthétisé par Boissonnas *et al.* [2]. La L-éthionine provient de California Corp. for Biochemical Research (Los Angeles). Les produits Sephadex ainsi que la colonne chromatographique (type K15/90) ont été obtenus chez Pharmacia (Uppsala). L'hydroxylapate a été préparée selon Levin [3].

Croissance des bactéries

La plupart des expériences ont été réalisées avec des cellules d'*E. coli* K12 provenant de Grain Processing Corp. (Muscatine, Iowa); ces bactéries ont été cultivées en milieu minimal «63» [4] et recueillies en phase de croissance exponentielle. Pour certaines expériences, des cellules d'*E. coli* K12 ont été cultivées dans un milieu enrichi, de la composition suivante: extrait de levure 5 g/l, hydrolysate de caséine 40 g/l, phosphate dipotassique 6,4 g/l, glucose 8 g/l, solution saline 10 ml/l. La solution saline contient, par litre, 40 g de phosphate d'ammonium, 3 g de chlorure de potassium, 1 g de sulfate de magnésium, 1 g de sulfate de zinc, 1 g de chlorure de calcium et 0,8 g de chlorure ferrique. Le pH du milieu est de 7,9 avant stérilisation.

Préparation des extraits bruts

Les cellules (10 g en poids humide) sont suspendues dans 40 ml de tampon phosphate de potassium 0,02 M à pH 7,4 contenant du 2-mercaptoéthanol 0,01 M. Le lysat obtenu après rupture des cellules au moyen d'un générateur d'ultra-sons Raytheon de 10 Kc, est centrifugé pendant 20 minutes à 16.000 $\times$ g.

Dosages enzymatiques

La formation d'amino-acyl adénylate est mesurée par la réaction d'échange ATP- 32 P]PP $_i$ dans les conditions précédemment décrites [1]. L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse, en 15 minutes à 37°, la formation de 1 nmole d'ATP marqué.

La formation d'amino-acyl-tRNA est mesurée selon Fangman et Neidhardt [5], en présence de 2 mg/ml de tRNA non fractionné. L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse, en 10 minutes à 30°, la formation de 1 nmole d'amino-acyl-tRNA.

Divers

La chromatographie sur Sephadex G-200 ainsi que le dosage des protéines ayant servi de marqueurs ont été réalisés exactement comme décrit précédemment [6].

La centrifugation en gradient de densité de saccharose a été effectuée selon Martin et Ames [7]. La préparation enzymatique (0,2 à 0,4 ml) est appliquée sur 4,4 ml d'un gradient linéaire de saccharose (50 à 250 g/l) dans du tampon phosphate de potassium 0,02 M à pH 7,4 contenant du 2-mercaptoéthanol 0,01 M. Après une centrifugation à 39.000 tours/min dans un rotor SW 39 de centrifugeuse Spinco pendant 22 heures à 0°, les tubes sont percés et environ vingt fractions sont recueillies.

La concentration en protéines a été mesurée selon Lowry *et al.* [8] en utilisant la sérumalbumine de bœuf comme référence.

RÉSULTATS

Modification de la méthionyl-tRNA synthétase

Modification de l'enzyme au cours de l'incubation d'un extrait brut à 37°. L'incubation à 37° d'un extrait brut provenant d'*E. coli* K12 ou B provoque une modification de la méthionyl-tRNA synthétase, qui peut être mise en évidence par chromatographie sur Sephadex G-200. La Fig. 1 montre que cette modification se traduit par un accroissement considérable du volume d'élution de cet enzyme, tandis que dans les mêmes conditions, le volume d'élution d'autres amino-acyl-tRNA synthétases (phénylalaninyl-, alaninyl- et isoleucinyl-tRNA synthétases) ne subit pas de changement.

Effet du temps d'incubation sur la modification de l'enzyme. L'effet de l'incubation à 37° d'un extrait brut sur les deux activités de la méthionyl-tRNA synthétase est résumé dans le Tableau 1. On constate, en fonction de la durée d'incubation, une diminution de l'activité spécifique, ainsi qu'une augmentation du rapport de la capacité d'échange ATP-PP $_i$ à la capacité de charge.

La Fig. 2 représente le profil d'élution de la méthionyl-tRNA synthétase obtenu en filtrant sur Sephadex G-200 l'extrait brut incubé pendant 0, 1, 3 et 6 heures. Il apparaît que la modification de l'enzyme dépend de la durée d'incubation: elle est complète après 6 heures à 37°. Si l'on traduit les volumes d'élution en terme de poids moléculaire selon la relation empirique établie par Andrews [9] Whitaker [10] et Squire [11], on trouve un poids moléculaire ap-

Tableau 1. Effet de la durée d'incubation d'un extrait brut à 37°, sur les deux réactions catalysées par la méthionyl-tRNA synthétase

Durée d'incubation h	Réaction d'échange ATP-PP _i (A)		Formation de méthionyl-tRNA (C)		A/C
	activité spécifique unités/mg	activité résiduelle ^a %	activité spécifique unités/mg	activité résiduelle ^a %	
0	900	100	8,4	100	107
1	800	89	6,7	80	119
3	620	69	4,2	50	147
6	550	61	3,3	30	167

^a Exprimée par rapport à l'activité de l'extrait conservé à 0°.

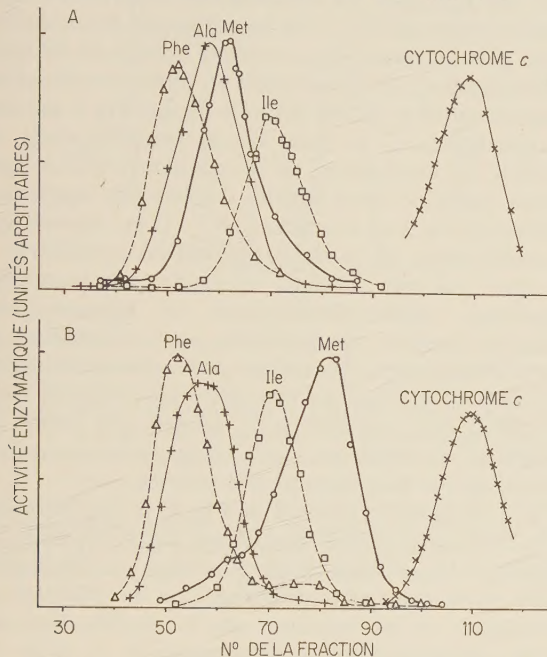


Fig. 1. Mise en évidence par chromatographie sur Sephadex G-200 de la modification de la méthionyl-tRNA synthétase provoquée par l'incubation d'un extrait brut à 37°. (A) Extrait brut conservé à 0°; (B) extrait brut incubé 6 heures à 37°. Un échantillon de 1,5 ml d'extrait brut contenant 27 mg de protéines a été appliqué sur une colonne de Sephadex G-200 (1,5 × 82 cm) équilibrée par du tampon phosphate de potassium 0,02 M à pH 7,4 contenant du KCl 0,1 M et du 2-mercaptoéthanol 0,01 M. Des fractions de 1,0 ml ont été recueillies à raison de 6 ml/h. La méthionyl- et l'isoleucyl-tRNA synthétases (O, Met; □, Ile) ont été localisées par la réaction d'échange ATP-PP_i. La phénylalaninyl- et l'alanyl-tRNA synthétases (Δ, Phe; +, Ala) ont été localisées par la réaction de charge. Le profil d'élution du cytochrome c (×, CYT) a été établi par mesure de l'absorbance à 415 mμ.

Fig. 2. Profil d'élution de la méthionyl-tRNA synthétase, obtenu en filtrant sur Sephadex G-200 un extrait brut soumis à une incubation de durée variable à 37°. Extrait brut conservé à 0° (A); extrait brut incubé à 37° pendant 1 h (B), 3 h (C) et 6 h (D). Un échantillon de 1,5 ml d'extrait brut contenant 27 mg de protéines a été appliqué sur une colonne de Sephadex G-200 (1,5 × 73 cm). Des fractions de 0,9 ml ont été recueillies à raison de 3 ml/h. La colonne a été calibrée par l'alcool déshydrogénase de levure (ADH), la tyrosyl-tRNA synthétase d'*E. coli*, la sérumalbumine de bœuf, la peroxydase de radis et le cytochrome c de cœur de cheval (CYT): leur volume d'élution correspond à 57, 61,8, 69,5, 75,7 et 96,4 ml respectivement. Les sommets des pics d'élution de l'alcool déshydrogénase et du cytochrome c sont indiqués par des flèches. L'activité de charge récupérée après chromatographie correspond à 94, 94, 108 et 95% de celle appliquée, pour les expériences A, B, C et D, respectivement.

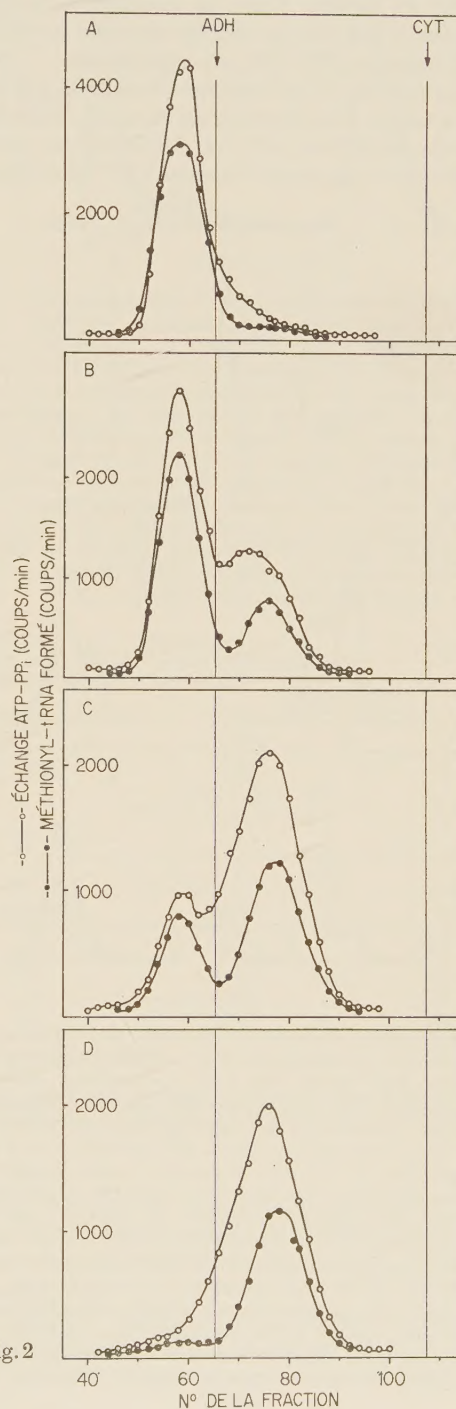


Fig. 2

parent de 175.000 pour l'enzyme natif et de 55.000 pour la forme modifiée. De plus, la forme modifiée catalyse non seulement la formation de méthionyl adénylate mais aussi celle de méthionyl-tRNA. Par ailleurs, quelle que soit la durée de l'incubation, une fraction faible mais non négligeable de l'activité d'échange ATP-PP_i se situe dans la zone d'éluion des protéines dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 90.000. Dans les conditions de dosage appliquées, l'activité de charge associée à cette activité d'échange ATP-PP_i est négligeable.

La modification de l'enzyme ne dépend pas seulement du temps d'incubation de l'extrait, mais également de la dilution de celui-ci. Ainsi, lorsque l'extrait brut est incubé pendant 6 heures à 37° aux dilutions

de 0, 12, 50, 200 et 800 fois, le pourcentage d'activité d'échange ATP-PP_i catalysé par la forme native de l'enzyme est de 0, 17, 39, 46 et 59 %, respectivement. La modification de l'enzyme est donc défavorisée par une dilution préalable de l'extrait brut.

Effet des conditions de croissance sur la modification de l'enzyme. Afin d'évaluer l'effet des conditions de croissance sur le phénomène étudié, des cellules d'*E. coli* K12 ont été cultivées au laboratoire dans le milieu minimal «63». Les bactéries ont été recueillies d'une part en phase exponentielle (temps de division de 60 minutes), et d'autre part en phase stationnaire, 5 heures après le début de celle-ci. La Fig.3 montre la répartition, à la suite d'une centrifugation en gradient de saccharose, de la méthionyl-tRNA synthétase présente dans chacun des extraits après une incubation de 2 et 4 heures à 37°. Il en ressort que la modification de la méthionyl-tRNA synthétase a lieu quel que soit l'état de croissance des bactéries; cependant, cette modification est apparemment favorisée lorsque les bactéries sont recueillies en phase stationnaire. Précisons que la forme modifiée de l'enzyme n'a pas pu être mise en évidence dans un extrait brut conservé à 0°, quelles que soient les conditions de croissance ou la composition du milieu de culture des bactéries dont il provient.

Comme nous le montre la Fig.3, la modification de la méthionyl-tRNA synthétase peut être mise en évidence non seulement par filtration sur Sephadex G-200, mais aussi par centrifugation en gradient de saccharose; ce fait confirme que la modification observée correspond à une diminution de la taille de la molécule d'enzyme.

Afin d'examiner l'effet de la composition du milieu de culture des bactéries sur la modification de l'enzyme, des cellules d'*E. coli* K12 ont été cultivées en milieu minimal (temps de division 60 minutes) et en milieu enrichi (temps de division 40 minutes) puis recueillies en phase exponentielle. La Fig.4 montre le profil de sédimentation en gradient de saccharose de l'activité d'échange ATP-PP_i dans chaque extrait après une incubation de 6 heures à 37°. Dans ces conditions d'incubation, la modification de l'enzyme est complète dans l'extrait de bactéries cultivées en milieu minimal, et partielle dans l'extrait de bactéries cultivées en milieu enrichi.

Ainsi, la composition du milieu de culture et l'état de croissance des bactéries n'influent que sur le degré de la modification de la méthionyl-tRNA synthétase.

Propriétés de la méthionyl-tRNA synthétase modifiée

Isolement par chromatographie sur hydroxylapatite.

La modification de l'enzyme a pu être mise en évidence par un critère différent de celui de la masse moléculaire. La Fig.5 montre le profil d'éluion de la méthionyl-tRNA synthétase obtenu en fractionnant

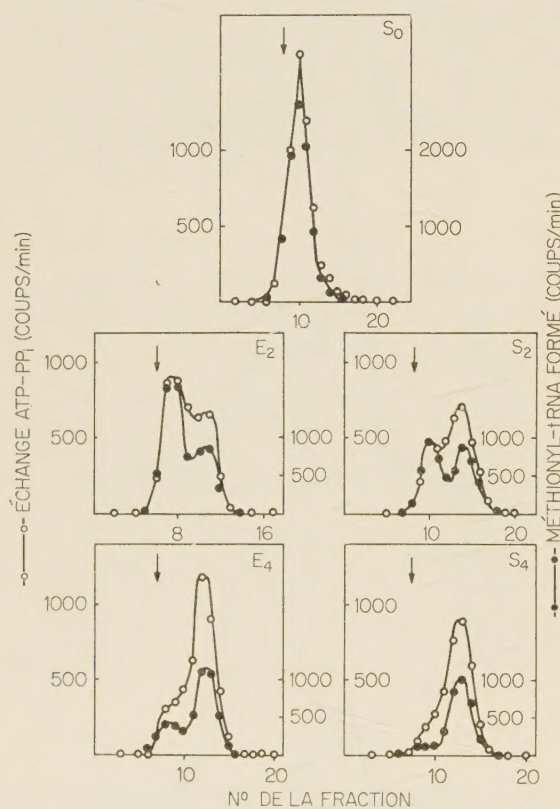


Fig.3. Effet des conditions de croissance des bactéries sur la modification de la méthionyl-tRNA synthétase provoquée par l'incubation d'un extrait brut à 37°. Les cellules cultivées en milieu minimal «63» ont été recueillies en phase exponentielle et en phase stationnaire. Les extraits bruts préparés à partir de ces cellules ont été incubés à 37° pendant 2 et 4 heures. Un échantillon de 0,2 ml de chaque extrait incubé a été ensuite centrifugé en gradient de densité de saccharose (voir Méthodes). Les flèches indiquent la position de l'alcool déshydrogénase. La sédimentation s'effectue de droite à gauche. S₀, S₂, S₄: extrait brut de cellules recueillies en phase stationnaire, incubé à 37° pendant 0, 2 et 4 heures, respectivement. E₂, E₄: extrait brut de cellules recueillies en phase exponentielle, incubé à 37° pendant 2 et 4 heures, respectivement. Le profil de sédimentation de la méthionyl-tRNA synthétase de cet extrait non incubé est identique à celui de S₀.

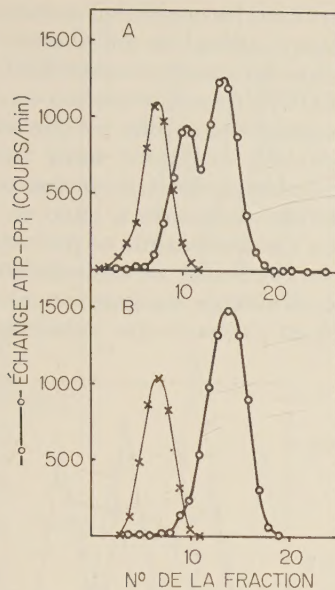


Fig. 4. Effet de la composition du milieu de culture des bactéries sur la modification de la méthionyl-tRNA synthétase provoquée par l'incubation d'un extrait brut à 37°. Les cellules, cultivées dans le milieu minimal «63» et dans le milieu enrichi décrit dans le chapitre des Méthodes, ont été recueillies en phase exponentielle. Les extraits bruts de ces cellules sont incubés à 37° pendant 6 heures. Un échantillon de 0,2 ml de chaque extrait incubé a été ensuite centrifugé en gradient de densité de saccharose. Extrait brut de cellules cultivées en milieu enrichi (A), ou en milieu minimal (B), incubé à 37° pendant 6 heures. O, méthionyl-tRNA synthétase; X, alcool déshydrogénase

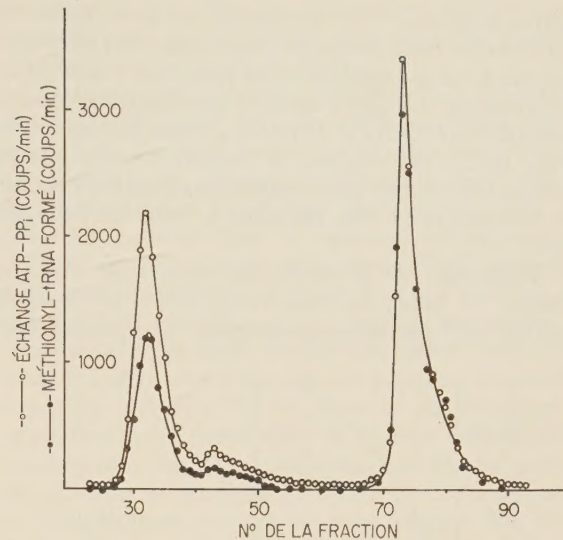


Fig. 5. Chromatographie sur hydroxylapatite de la méthionyl-tRNA synthétase provenant d'un extrait brut incubé à 37° pendant 105 minutes. L'extrait incubé a été dialysé contre du tampon phosphate de potassium 0,01 M à pH 6,8 contenant du 2-mercaptoéthanol 0,01 M. Un échantillon (14 mg de protéines) a été appliqué sur une colonne d'hydroxylapatite (1,6 x 13 cm) équilibrée dans le même tampon. L'élution a été réalisée au moyen d'un gradient linéaire de 0,01 M à 0,18 M de phosphate de potassium à pH 6,8, contenant du 2-mercaptoéthanol 0,01 M, le volume total de l'éluant étant de 700 ml. Des fractions de 6,1 ml ont été recueillies à raison de 14 ml/h. L'activité d'échange ATP-PP_i et de charge récupérée après chromatographie est de 102% et 99%, respectivement, de celle appliquée

Tableau 2. Constantes de Michaelis-Menton des deux formes de la méthionyl-tRNA synthétase^a

A — Réaction d'échange ATP-PP _i	Enzyme natif		Enzyme modifié	
	<i>K_m</i>	<i>K_t</i>	<i>K_m</i>	<i>K_t</i>
	M	M	M	M
L-méthionine	$4,6 \times 10^{-5}$	—	$6,0 \times 10^{-5}$	—
L-éthionine	$1,3 \times 10^{-2}$	—	$3,4 \times 10^{-3}$	—
L-méthioninyl adénylate ^b	—	$8,7 \times 10^{-9}$	—	$1,0 \times 10^{-8}$
B — Réaction de charge	<i>K_m</i>		<i>K_m</i>	
	apparent	corrigé ^c	apparent	corrigé ^c
	mg/ml	μM	mg/ml	μM
tRNA non-fractionné	1,2	1,0	1,4	1,1
tRNA _M	0,5	1,2	0,67	1,6
tRNA _F	0,13	1,7	0,08	1,0

^a Les deux formes de l'enzyme ont été isolées par chromatographie sur hydroxylapatite (voir Fig. 5).

^b Le *K_t* du L-méthioninyl adénylate a été déterminé en présence de L-méthionine.

^c Les valeurs de *K_m* corrigé ont été calculées en tenant compte, pour chaque préparation de tRNA, du pourcentage de molécules capables d'accepter la méthionine dans des conditions saturantes de dosage. Ce pourcentage atteint la valeur de 2, 6 et 32%, dans le cas du tRNA non fractionné, du tRNA_M et du tRNA_F, respectivement.

sur une colonne d'hydroxylapatite un extrait brut incubé à 37° pendant 105 minutes, (cette durée d'incubation n'assurant qu'une modification partielle de l'enzyme). On observe, en plus du pic d'activité de l'enzyme natif élué lorsque la molarité du phosphate de potassium atteint 0,1 M à pH 6,8, un second pic d'activité dont la molarité d'élution est plus basse

(0,05 M). Ce dernier, auquel sont associées les deux activités caractéristiques de la méthionyl-tRNA synthétase, correspond à la forme modifiée de l'enzyme (voir plus loin).

Propriétés cinétiques. Le Tableau 2 donne les constantes cinétiques de l'enzyme natif et de l'enzyme modifié, séparés par chromatographie sur

hydroxylapatite. On n'observe aucune différence significative dans l'affinité de chacune des deux formes vis-à-vis des substrats des réactions d'activation et de charge. La Fig. 6 montre que l'enzyme modifié reconnaît le tRNA_F et le tRNA_M aussi bien que l'enzyme natif; par contre, le rapport de son activité maximale de charge à son activité maximale d'échange est environ deux fois inférieur à celui de l'enzyme natif.

Évaluation de la taille moléculaire de l'enzyme modifié. Le poids moléculaire apparent de l'enzyme modifié isolé par chromatographie sur hydroxylapa-

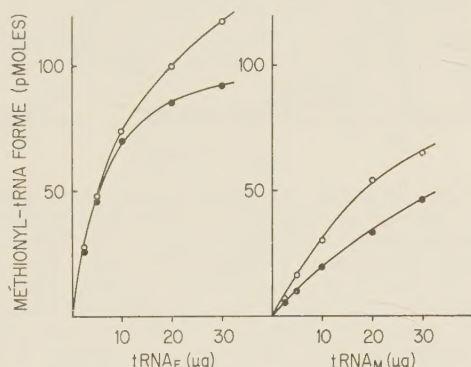


Fig. 6. Charge du tRNA_F et du tRNA_M par chacune des deux formes de l'enzyme. La formation de méthionyl-tRNA a été mesurée dans les conditions de dosage standard: 10 μ moles de tampon Tris-HCl à pH 7,4, 1 μ mole de MgCl₂, 1 μ mole de KCl, 200 nmoles de glutathion, 200 nmoles d'ATP (Na), 2 nmoles de L-[¹⁴C]méthionine, 2,5 à 30 μ g de tRNA_F ou de tRNA_M et des quantités limitantes d'enzyme, dans un volume final de 0,1 ml, ont été incubés 10 minutes à 30°. Les deux formes de l'enzyme ont été isolées par chromatographie sur hydroxylapatite. La quantité d'enzyme natif (○) et d'enzyme modifié (●) utilisée possédait la même activité dans la réaction d'échange ATP-PP_i: 8,8 nmoles de [³²P]-ATP formées en 15 minutes à 37° pour un volume réactionnel de 0,1 ml. Les valeurs de K_m vis-à-vis du tRNA_F et du tRNA_M calculées à partir de ces résultats figurent dans le Tableau 2

tite a été estimé à 54.000 par filtration sur une colonne de Sephadex G-100 étalonnée par l'alcool déshydrogénase, la sérumalbumine, la peroxidase et le cytochrome *c*. Par centrifugation en gradient de saccharose (Fig. 7), le coefficient de sédimentation de l'enzyme modifié a été évalué à 3,6, 3,7 ou 4,4 S selon que l'on utilise comme protéine de référence le cytochrome *c* (1,9 S), la peroxidase (3,5 S) ou l'alcool déshydrogénase (7,4 S), respectivement. Dans les mêmes conditions de centrifugation, le coefficient de sédimentation de l'enzyme natif est de 6,3 ou 6,5 S, selon que l'on se réfère au cytochrome *c* ou à l'alcool déshydrogénase.

Afin de déterminer si cette modification de la méthionyl-tRNA synthétase est réversible en présence de ses substrats, l'expérience suivante a été réalisée: l'enzyme modifié a été incubé 20 minutes à

30°, d'une part dans les conditions assurant la formation de méthionyl-adénylate (en absence de PP_i) et d'autre part dans les conditions assurant la formation de méthionyl-tRNA (la concentration en substrats et en ions magnésium étant celle utilisée au cours des dosages d'activité). L'enzyme ainsi incubé a été ensuite centrifugé en gradient de saccharose contenant tous les substrats nécessaires à l'une ou l'autre des deux réactions. Ces traitements ne provoquent aucun changement du coefficient de sédimentation de l'enzyme modifié. L'absence de transformation de l'enzyme modifié en présence des substrats des deux

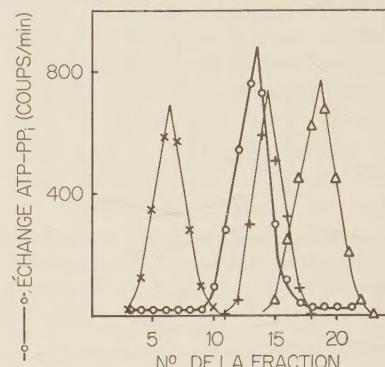


Fig. 7. Profil de sédimentation en gradient de densité de saccharose de l'enzyme modifié. L'enzyme modifié (provenant des fractions 30 à 36 de la colonne d'hydroxylapatite présentée dans la Fig. 5) a été soumis à une centrifugation en présence de 0,1 mg d'alcool déshydrogénase (×), de 0,5 mg de peroxidase (+) et de 0,3 mg de cytochrome *c* (Δ). L'activité d'échange ATP-PP_i (○) récupérée après centrifugation représente 91 % de celle appliquée

réactions, implique que la capacité de former le méthionyl-adénylate et celle de former le méthionyl-tRNA sont des propriétés intrinsèques de la molécule d'enzyme modifié.

Mise en évidence d'un facteur nécessaire à la modification de la méthionyl-tRNA synthétase

La modification de la méthionyl-tRNA synthétase observée après incubation d'un extrait brut n'a pu être mise en évidence ni par incubation de l'enzyme pur [1], ni même par incubation de préparations partiellement purifiées selon Bergmann *et al.* [12] ou selon Martin *et al.* [13]. Par contre, l'enzyme se modifie même lorsqu'il a été isolé par filtration d'un extrait brut sur Sephadex G-25. Ces résultats conduisent à supposer l'existence d'un facteur macromoléculaire nécessaire à la modification de l'enzyme. En vue de l'identification de ce facteur, l'extrait brut a été soumis à divers fractionnements.

Mise en évidence du facteur dans le sédiment à 105.000 $\times$ g d'un extrait brut. La Fig. 8 montre le profil de sédimentation en gradient de saccharose de la méthionyl-tRNA synthétase provenant d'une part,

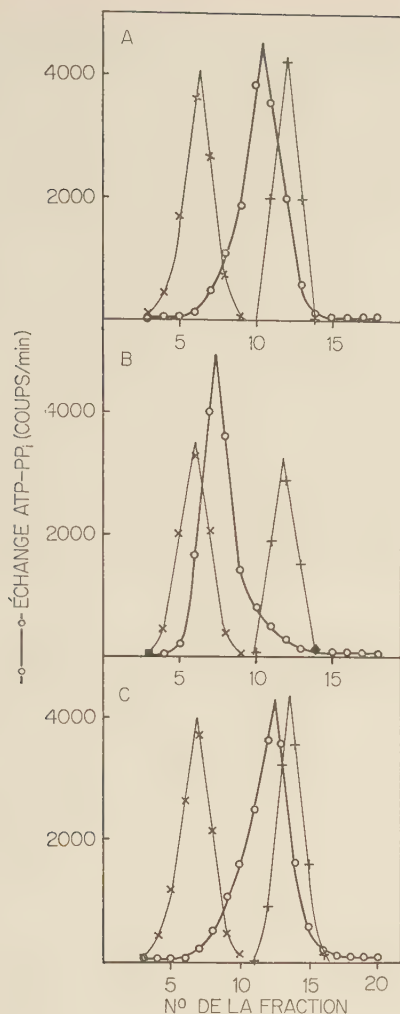


Fig.8. Mise en évidence dans le sédiment à $105.000 \times g$ d'un extrait brut, du facteur nécessaire à la modification de la méthionyl-tRNA synthétase. Après centrifugation de 15 ml d'extrait brut à $105.000 \times g$ pendant $4\frac{1}{2}$ heures, la partie supérieure du surnageant ($\frac{4}{5}$ du volume total) a été prélevée; après élimination du surnageant restant, le tube de centrifugation a été rincé par du tampon phosphate de potassium 0,02 M à pH 7,4 contenant du 2-mercaptoéthanol 0,01 M et le culot a été remis en suspension dans 15 ml du même tampon. Le surnageant (1 ml) a été incubé 6 heures à 37° , en présence soit de 1 ml de tampon, soit de 1 ml du culot remis en suspension. Des échantillons de 0,2 ml de ces mélanges incubés et de l'extrait brut non fractionné incubé dans les mêmes conditions et à la même dilution, ont été centrifugés en gradient de saccharose. Extrait brut incubé 6 heures à 37° (A); surnageant incubé 6 heures à 37° en absence (B) et en présence (C) de la fraction qui sédimente à $105.000 \times g$. O, méthionyl-tRNA synthétase; x, alcool déshydrogénase; +, peroxidase

d'un extrait brut incubé 6 heures à 37° et d'autre part, du surnageant $105.000 \times g$ incubé dans les mêmes conditions, en absence ou en présence de la fraction qui sédimente à $105.000 \times g$. On constate que l'enzyme, contenu dans le surnageant, ne se modifie qu'en

présence de la fraction qui sédimente à $105.000 \times g$. Il apparaît donc que le facteur fait partie des constituants les plus lourds de l'extrait.

Isolement du facteur par filtration d'un extrait brut sur Sephadex G-200. Afin de confirmer l'observation précédente, l'extrait brut a été fractionné sur Sephadex G-200 et les fractions contenant, d'une part, la méthionyl-tRNA synthétase et, d'autre part, les constituants élués dans le volume d'exclusion de la colonne, ont été séparément réunies (Fig.9). L'enzyme ainsi isolé a été ensuite incubé 6 heures à 37° en absence ou en présence de la fraction contenant les constituants de poids moléculaire élevé, puis a été soumis à une centrifugation en gradient de saccharose (Fig.10 A et 10 B). On observe que l'enzyme ne se modifie qu'en présence de la fraction contenant les constituants les plus lourds de l'extrait. De plus, il est possible de modifier l'enzyme totalement purifié en l'incubant en présence de cette fraction (Fig.10 C). La modification partielle observée dans ces conditions

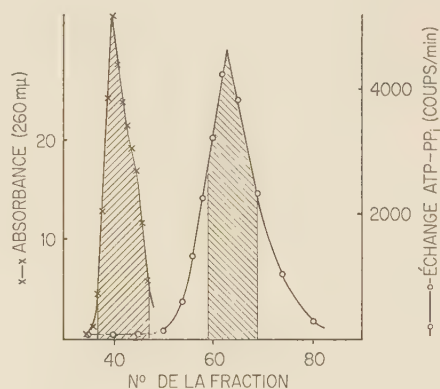


Fig.9. Isolement par chromatographie sur Sephadex G-200 de la méthionyl-tRNA synthétase et des constituants de poids moléculaire élevé de l'extrait. L'extrait (1,5 ml) a été appliqué sur une colonne de Sephadex G-200 identique à celle de la Fig.1, et des fractions de 1,0 ml ont été recueillies à raison de 6 ml/hr. La méthionyl-tRNA synthétase a été localisée par la réaction d'échange ATP-PPi tandis que les constituants de poids moléculaire élevé, élués au volume d'exclusion de la colonne, ont été localisés par mesure de l'absorbance à 260 mμ. Les échantillons utilisés dans l'expérience résumée dans la Fig.10 proviennent de la réunion des fractions qui se trouvent dans les zones hachurées

est attribuée à la dilution importante à laquelle l'enzyme et le facteur ont été incubés.

Il apparaît donc que la modification de la méthionyl-tRNA synthétase est due à l'action d'un facteur extrinsèque. La localisation de ce facteur parmi les constituants de poids moléculaire élevé n'implique pas nécessairement qu'il ait lui-même un poids moléculaire élevé: il pourrait, par exemple, être associé aux ribosomes. La caractérisation de ce facteur ainsi que la purification de l'enzyme modifiée sont en cours.

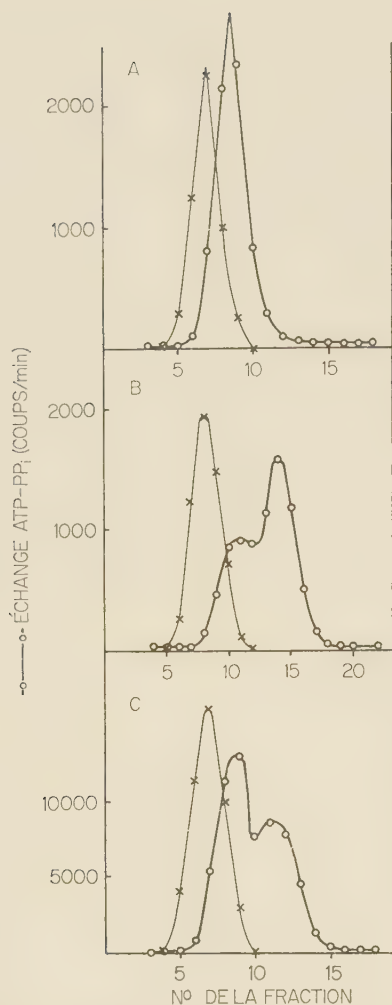


Fig. 10. Mise en évidence, dans la fraction contenant les constituants de poids moléculaire élevé isolée par chromatographie sur Sephadex G-200, du facteur nécessaire à la modification de la méthionyl-tRNA synthétase. A la suite de la chromatographie sur Sephadex G-200 (voir Fig. 9) la méthionyl-tRNA synthétase (1 ml) a été incubée 6 heures à 37° en présence soit de 1 ml du tampon d'élution de la colonne, soit de 1 ml de la fraction contenant les constituants de poids moléculaire élevé. D'autre part, l'enzyme pur (10 µg dans 5 µl) a été soumis à une incubation identique en présence de 1,3 ml de la fraction contenant les constituants de poids moléculaire élevé. Un échantillon de 0,2 ml de chacun de ces mélanges incubés a été centrifugé en gradient de saccharose. Méthionyl-tRNA synthétase isolée par chromatographie sur Sephadex G-200, incubée 6 heures à 37° en absence (A) et en présence (B) de la fraction contenant les constituants de poids moléculaire élevé; méthionyl tRNA synthétase pure, incubée 6 heures à 37° en présence de la fraction contenant les constituants de poids moléculaire élevé (C). O, méthionyl-tRNA synthétase; ×, alcool déshydrogénase

DISCUSSION

Les résultats présentés ci-dessus montrent que l'incubation d'un extrait brut à 37° provoque une modification de la taille de la méthionyl-tRNA syn-

thétase, le poids moléculaire apparent de l'enzyme étant de 175.000 pour la forme native et de 55.000 pour la forme modifiée.

L'hypothèse selon laquelle cette modification serait la conséquence d'une rupture de liaison covalente provoquée par un enzyme protéolytique, peut être écartée par les arguments suivants:

a) La modification de la méthionyl-tRNA synthétase est sélective. En effet, il a été vérifié que dans les conditions où cet enzyme se modifie, les enzymes d'activation spécifiques pour la phénylalanine, l'alanine, l'isoleucine et la cystéine ne sont pas modifiés. De plus, il est vraisemblable que la tyrosyl- [14] et la valyl-tRNA synthétases [15] ne seraient pas modifiées dans nos conditions d'incubation, puisque leur purification comporte une étape d'autolyse (incubation à 37° d'un extrait brut pendant une période de 2 à 8 heures), et que le poids moléculaire des enzymes ainsi purifiés est en bonne concordance avec celui qu'on peut leur attribuer par filtration sur Sephadex G-200 d'un extrait brut non-autolysé [6].

b) La modification de la méthionyl-tRNA synthétase n'entraîne pas de changement notable de ses propriétés enzymatiques. En effet, les constantes d'affinité de la forme modifiée vis-à-vis des substrats de la réaction d'activation et de charge sont du même ordre que celles de l'enzyme natif. De plus l'enzyme modifié reconnaît aussi bien le tRNA_F que le tRNA_M.

c) L'enzyme modifié se comporte en chromatographie sur hydroxylapatite et sur Sephadex G-200, ainsi qu'en centrifugation en gradient de saccharose, comme un matériel homogène. Son poids moléculaire apparent a été évalué par chromatographie sur Sephadex G-200 et G-100 à 56.000 ± 2.000 , cette valeur étant la moyenne de 5 déterminations.

L'ensemble de ces observations conduit à considérer cette modification comme une dissociation de l'enzyme en sous-unités actives. Cette hypothèse est d'autant plus plausible, qu'une étude précédente a démontré que la méthionyl-tRNA synthétase, d'un poids moléculaire de 173.000, est un enzyme composé de quatre sous-unités [1]. Cette conclusion était fondée sur le fait qu'en présence d'urée 8 M, ou de chlorhydrate de guanidine 6 M, l'enzyme se dissocie en sous-unités d'un poids moléculaire de 43.000 et que, par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence d'urée 8 M, ce matériel apparaît comme homogène. Le rapport existant entre la sous-unité obtenue en traitant l'enzyme pur par des agents dissociants, et la sous-unité active décrite dans le présent travail reste à démontrer.

Il ressort de ce travail, que la masse moléculaire minimale de la méthionyl-tRNA synthétase capable de catalyser les deux réactions caractéristiques de l'enzyme natif, est de l'ordre de 55.000. Cette valeur est sensiblement plus basse que celle d'environ 100.000 couramment admise comme étant le poids

moléculaire minimum d'un enzyme d'activation fonctionnel [16]; cependant, rappelons qu'une étude du comportement chromatographique sur Sephadex G-200 de l'ensemble des enzymes d'activation d'*E. coli* a démontré que la cystéinyl-tRNA synthétase possède un poids moléculaire apparent de 45.000 [6].

Le phénomène de dissociation que nous décrivons fait intervenir un facteur extrinsèque, de nature macromoléculaire, qui a pu être localisé. Ce facteur pourrait provoquer une modification de l'enzyme entraînant sa dissociation, à l'instar de celle qui intervient, par exemple, dans la dissociation de la phosphorylase *a* en phosphorylase *b* [17].

Nous remercions Mlle Y. Mathien pour son excellente collaboration technique. Ce travail a bénéficié de subventions de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Convention 6600140) et du Commissariat à l'Energie Atomique.

Cet article sera inclus dans les travaux présentés pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences de l'Université de Paris (D.C.).

BIBLIOGRAPHIE

1. Lemoine, F., Waller, J. P., et Van Rapenbusch, R., *European J. Biochem.* 4 (1968) 213.
2. Cassio, D., Lemoine, F., Waller, J. P., Sandrin, E., et Boissonnas, R. A., *Biochemistry*, 6 (1967) 827.

3. Levin, O., dans *Methods in Enzymology* (publié par S. P. Colowick, et N. O. Kaplan). Academic Press, New York 1962, Vol. 5, p. 27.
4. Cohen, G. N., et Rickenberg, H. V., *Ann. Inst. Pasteur*, 91 (1956) 693.
5. Fangman, W. L., et Neidhardt, F. C., *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1839.
6. Lemoine, F., Cassio, D., et Waller, J. P., soumis à *European J. Biochem.* 4 (1968) 222.
7. Martin, R. G., et Ames, B. N., *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1372.
8. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, N., et Randall, R., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
9. Andrews, P., *Nature*, 196 (1962) 36.
10. Whitaker, J. R., *Anal. Chem.* 35 (1963) 1950.
11. Squire, P. G., *Arch. Biochem. Biophys.* 107 (1964) 471.
12. Bergmann, F. H., Berg, P., et Dieckmann, M., *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1735.
13. Martin, E. M., Yegian, C., et Stent, G. S., *Z. Vererbungslehre*, 94 (1963) 303.
14. Calendar, R., et Berg, P., *Biochemistry*, 5 (1966) 1681.
15. George, H., et Meister, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 165.
16. Novelli, G. D., *Ann. Rev. Biochem.* 36 (1967) 449.
17. Graves, D. J., Fisher, E. H., et Krebs, E., *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 805.

D. Cassio et J. P. Waller
Laboratoire d'Enzymologie du C. N. R. S.
F-91 Gif-sur-Yvette, France

